

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

CC

(11)Publication number : 2001-004624

(43)Date of publication of application : 12.01.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
G01N 33/543

(21)Application number : 11-178168

(71)Applicant : A &amp; T:KK

(22)Date of filing : 24.06.1999

(72)Inventor : IWAMOTO HISAHIKO  
MIURA KEISUKE  
YOSHIMURA YOSHINORI

## (54) AGE PROTEIN ASSAY REAGENT AND MEASUREMENT THEREOF

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure AGE(advanced glycation end product) protein quicker and easier than by a conventional immunoassay method by including latex with a sensitized antibody specifically recognizing AGE (terminal glycosylation product) protein and quaternary ammonium salt together.

SOLUTION: In measurement of AGE protein in a sample, because of coexistence of latex with a sensitized antibody specifically recognizing AGE protein with quaternary ammonium salt, non-specific coagulation can be suppressed, and storage stability of the latex sensitized with an AGE protein specifically recognizable antibody is improved. In this process, sensitization of the latex with an AGE protein antibody is carried out at 4-50° C through a physical adsorption method usually, however, its method is not limited and chemical binding to the latex surface may be used, for example. Though sensitization may be carried out at any pH, sensitization at pH of 4-10 is desirable because configuration of the antibody is hardly changed.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-4624

(P2001-4624A)

(43) 公開日 平成13年1月12日 (2001.1.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
33/543	5 8 1	33/543	5 8 1 J
			5 8 1 G

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平11-178168	(71) 出願人	591258484 株式会社エイアンドティー 東京都日野市日野320番地の11
(22) 出願日	平成11年6月24日 (1999.6.24)	(72) 発明者	岩本 久彦 東京都日野市日野320-11 株式会社エイ アンドティー内
		(72) 発明者	三浦 圭介 東京都日野市日野320-11 株式会社エイ アンドティー内
		(72) 発明者	吉村 佳典 東京都日野市日野320-11 株式会社エイ アンドティー内
		(74) 代理人	100080609 弁理士 大島 正孝

(54) 【発明の名称】 AGE化タンパクの定量用試薬および測定法

(57) 【要約】

【課題】 従来の免疫学的測定法よりも更に迅速かつ簡便にAGE化タンパクを測定でき、非特異的な凝集反応が起これにくく、かつ保存安定性の良いAGE化タンパク定量用試薬を提供する。

【解決手段】 AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスと第4級アンモニウム塩を共存させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスおよび第4級アンモニウム塩を組み合わせてなる、AGE化タンパク定量用試薬。

【請求項2】 AGE化タンパクを特異的に認識する抗体がカルボキシメチル化タンパクを特異的に認識する抗体である請求項1に記載の定量試薬。

【請求項3】 溶血試料中のAGE化タンパクを、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスと、第4級アンモニウム塩の存在下に免疫凝集反応せしめ、次いで免疫凝集物の濃度を測定することを特徴とする、AGE化タンパクの測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、AGE化タンパク定量用試薬およびその測定法に関する。更に詳しくは、試料中のAGE化タンパクを免疫反応にてラテックス凝集反応を利用して定量を行うに適した試薬およびその測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】AGE（終末糖化産物）は、糖尿病性合併症の重篤度（Brownlee, M., et al., 1988, N. Engl. J. Med., 318:1315-1321）や老化（Araki, N., et al., 1992, J. Biol. Chem., 267:10211-10214）、慢性腎疾患（Miyata, T., et al., 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7:1198-1206）、アルツハイマー病（Smith, M. A., et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5710）等と関連があることが明らかになってきており、上記疾患の診断、治療、予防あるいはその薬効評価に有用な指標とされている。AGE化タンパクのうち、カルボキシメチル化タンパク（以下、「CM化タンパク」と呼ぶこともある。）はAGE化タンパクの主成分であること（Reddy, S., et al., 1995, Biochemistry, 34:10872-10878）から、AGE化タンパクの有用な指標とされている。

【0003】従来、血液中のAGE化タンパクの測定は、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー／質量分析等の機器分析による方法で行われていた。しかしながら、機器分析による測定法は操作が煩雑であり感度も低いという問題点があることから、測定が容易で感度も高い抗原抗体反応による方法が多用されるようになった。抗原抗体反応によるAGE化タンパクの測定法としては、ELISA法（酵素標識免疫測定法）（特表平10-504640号公報）、ドットブロッキング法あるいはラテックス凝集法が知られているが、ELISA法においては、例えば、特表平10-504640

号公報に記してあるように、界面活性剤、蛋白変性剤等による被検体の前処理が必要であり、操作が煩雑で時間もかかるという問題がある。また、ELISA法、ドットブロッキング法とも機器分析よりは迅速で簡便なもの、半日～1日の時間を要し、操作においても熟練度が必要であるという問題があった。一方、ラテックス凝集法を用いた場合、測定操作は簡便でしかも迅速に測定できるという利点はあるものの、B/F分離を行わないためELISA法やドットブロッキング法に比べ非特異的な反応（凝集）が起こり易く、また、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスの保存安定性も悪いという欠点があった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者の目的は、ELISA法やドットブロッキング法よりも更に迅速かつ簡便にAGE化タンパクを測定でき、かつ非特異的な凝集反応が起こりにくく、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスの保存安定性も良い、ラテックス凝集法によるAGE化タンパクの定量用試薬を提供することにある。

【0005】本発明の他の目的は、本発明の上記定量用試薬を用いてラテックス凝集法によりAGE化タンパクを精度良く定量する方法を提供することにある。本発明の更に他の目的および利点は、以下の説明から明らかになる。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、試料中のAGE化タンパクを測定するにあたり、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスと第4級アンモニウム塩を共存させることによって非特異的な凝集が抑制でき、しかも、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスの保存安定性も向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明の上記目的および利点は、第1に、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスおよび第4級アンモニウム塩を組み合わせてなる、AGE化タンパク定量用試薬によって達成される。また、本発明の上記目的および利点は、第2に、溶血試料中のAGE化タンパクを、AGE化タンパクを特異的に認識する抗体が感作されたラテックスと、第4級アンモニウム塩の存在下に免疫凝集反応せしめ、次いで免疫凝集物の濃度を測定することを特徴とする、AGE化タンパクの測定法によって達成される。

## 【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明をより詳細に説明する。本発明のAGE化タンパクとは、メイラード反応の後期段階反応に見られる3つの特徴的な現象（蛍光性、褐色変化、および分子内／分子間架橋形成）の少なくとも1つを伴う反応生成物が付加したタンパク、および／或いはCM化タンパクを指す。3つの特徴的な現象の少

なくとも1つを伴う反応生成物として、例えば、ペントシジン化タンパク、イミダゾロン化タンパク、クロスリン化タンパク等が挙げられる。特に、CM化タンパクはAGE化タンパクを特異的に認識する抗体の主要なエпитープであり、また、糖尿病性の合併症を発症している患者においては該血中濃度が健常者のそれと比較して有意に高いことから、糖尿病性合併症用マーカーとして好適に用いられる。

【0009】かかるAGEが付加したタンパクの種類としては特に限定はされないが、例えば、血中濃度の高いアルブミン、寿命の長いヘモグロビン、沈着アミロイドの主要成分である $\beta 2$ -ミクログロブリン( $\beta 2M$ )、動脈硬化の発症と関連の深い低密度リポタンパク(LDL)や高密度リポタンパク(HDL)等が挙げらる。特に、ヘモグロビンは血液中のタンパクの中でも最も寿命が長いことが知られており、AGEが付加したタンパクの中でも好適なタンパクとして用いられる。

【0010】AGE化タンパクを特異的に認識する抗体(以下、「AGE化タンパク抗体」と呼ぶこともある。)は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製は公知の方法に従って行うことが出来る。本発明で用いるラテックスは、通常の免疫測定用担体として用いられているもの、例えば、スチレン、プロピレン、アクリルアミド、アクリロニトリル等の合成樹脂、またはこれらにそれ自体公知の方法により反応性官能基を導入したものであれば特に制限されず、使用できる。

【0011】ラテックスの形状は特に制限はされないが、球状のものがラテックスの製造が容易なこと、或いはAGE化タンパク抗体感作ラテックスの作製が容易なこと、から一般的に用いられている。AGE化タンパクを感作する球状ラテックスの平均粒子径は、抗原抗体反応後の凝集の起こり易さや凝集度(濁度)の測定、凝集度の判別のし易さなどの観点から0.05~0.5 $\mu m$ であることが好ましい。

【0012】AGE化タンパク抗体のラテックスへの感作は、一般的には物理的吸着法にて4~50℃で行われるが、これに限定されず、例えば化学的にラテックス表面に結合させてもよい。感作時のpHは特に制限はされないが、抗体の立体構造の変化が起こりにくいpH4~10で感作を行うことが好ましい。通常、ラテックスに対し0.001~10重量%程度のAGE化タンパク抗体を担持させたものが、AGE化タンパク抗体感作ラテックスとしてAGE化タンパク定量用試薬に供される。

【0013】AGE化タンパク定量用試薬を構成する第4級アンモニウム塩としては、例えば、塩化コリン、臭化コリン、塩化アセチルコリン、臭化アセチルコリン、塩化テトラメチルアンモニウム等が挙げられる。これらの化合物は、1種類または2種類以上で使用される。抗原抗体反応時の第4級アンモニウム塩の濃度は0.1重

量%以上であることが好ましい。これ以下の濃度だと、第4級アンモニウム塩の添加効果が見られ難くなる。

【0014】本発明のAGE化タンパク定量用試薬を用いて、AGE化タンパクを測定する方法は、例えば、以下のようにして行われる。AGE化タンパクを含むかもしれない試料、およびAGE化タンパク抗体が感作されたラテックスが含まれる溶液に、少なくとも1種類の第4級アンモニウム塩を共存させて抗原抗体反応を起こさせ、吸光度を測定し、そしてこの測定値から試料中のAGE化タンパクを定量する。

【0015】上記試料としては、AGE化タンパクを含むかもしれない試料であれば特に限定はされないが、本発明のAGE化タンパク定量用試薬を臨床検査薬として用いる場合の試料としては、血液、血漿、血清、尿等が挙げられる。また、第4級アンモニウム塩は、試料あるいはAGE化タンパク抗体が感作されたラテックスが含まれる溶液に予め添加しておいても、或いは試料とAGE化タンパク抗体が感作されたラテックスが含まれる溶液を混合するする時に第4級アンモニウム塩の水溶液を添加してもよい。

【0016】上記抗原抗体反応開始後、上記混合液の吸光度は340~800nmの範囲から適切な波長を選択して測定される。吸光度の測定は、特定の時間の吸光度を求めてもよいし、特定の2点の吸光度を測定し、その間の吸光度の増加分または単位時間当たりの増加分を求めてもよい。AGE化タンパクの定量は、既知量のAGE化タンパクを含む試料を用いて上記測定方法にて吸光度または吸光度増加分を求め、AGE化タンパク濃度と吸光度または吸光度増加分との関係から検量線を作成し、次いで同一条件で未知量のAGE化タンパクを含む試料の吸光度または吸光度増加分を求め、前記検量線から吸光度または吸光度増加分に対応するAGE化タンパク濃度を求めることにより行われる。

【0017】

【発明の効果】本発明のAGE化タンパク定量用試薬を用いることにより、被検体中のAGE化タンパク濃度を簡便かつ迅速に測定でき、かつ非特異的な凝集反応を抑制できた。また、該試薬の構成成分であるAGE化タンパク抗体が感作されたラテックスの保存安定性も向上する。

【0018】AGE化タンパク定量用試薬に第4級アンモニウム塩を共存させることによって非特異的な凝集が抑制できかつAGE化タンパク抗体感作ラテックスの保存安定性を向上できる理由は必ずしも明らかではないが、第4級アンモニウム塩を添加することにより反応系内のイオン強度が高くなったことが一因となって、タンパク間の非特異的な結合が抑制でき、ひいてはAGE化タンパク抗体感作ラテックスの分散性も良くなり、保存安定性が向上したのではないかと考えられる。

【0019】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

#### 【0020】実施例1～5

##### (1) CM化ヘモグロビン抗体の調製

ハイブリドーマ2B3株(寄託番号:生命研菌寄第16632号(FERMP-16632))を、10%FCSを含むRPMI-1640培地で培養した。ハイブリドーマの培養上清に等量の飽和硫酸アンモニウムを加え、遠心分離し沈殿を分取した。この沈殿を少量の10 mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)に溶解させ、同じ緩衝液に対して透析した。透析後遠心分離し不溶物を除き、これをDEAE-セルロースカラムにかけた。緩衝液で洗浄後、食塩濃度勾配により溶出しIgG画分を分取した。この画分をゲル濾過HPLCカラム(バイオラッド社、Bio-Sil TSK250)にかけ、クロマトグラフィーを行うことにより精製モノクローナル抗体を得た。

##### 【0021】(2) 甲剤(CM化ヘモグロビン抗体担持ラテックス懸濁液)の調製

20 mMリン酸緩衝液(pH7.2)で希釈した平均粒子径0.32 μm、ラテックス濃度1%のポリスチレン粒子(藤倉化成(株)、Cat. No. 2880)懸濁液5 mlと、20 mMリン酸緩衝液(pH7.2)で希釈した0.3 mg/mlのCM化ヘモグロビン抗体溶液5 mlを混合し、37℃で1時間静置した。次いで、0.25%牛血清アルブミン(SIGMA)を含む20 mMリン酸緩衝液(pH7.2)10 mlを添加し、更に、37℃で2時間静置した。得られたCM化ヘモグロビン抗体担持ラテックスを遠心分離にて20 mMリン酸緩衝液(pH7.2)で2回洗浄した後、33.5 mlの100 mM塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、並び \*

＊に7.5%スクロースを含む100 mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)を沈さに加えて甲剤を調製した。

##### 【0022】(3) 乙剤(緩衝液)の調製

100 mM塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、1.9%ポリビニルピロリドンK30(東京化成(株)、分子量40,000)、並びに表1に示す塩化コリン濃度となるように、100 mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に加えて乙剤とした。

##### 【0023】(4) 被検体

アミノ酸分析でカルボキシメチルバリン(以下、「CMV」と呼ぶこともある。)濃度が確認されている糖尿病患者の全血、赤血球画分、および血漿画分を用いた。アミノ酸分析の結果から、該全血中、赤血球画分中、血漿画分中のCMV濃度は、それぞれヘモグロビン1 mg当たり30 pmol、30 pmol、検出限界以下(2 pmol以下)であった。

##### 【0024】(5) 測定法

乙剤220 μlに被検体10 μlをガラスセル中で添加攪拌した後、37℃で約5分間静置した。次いで甲剤を100 μl添加して攪拌し、30秒後から200秒までの波長804 nmにおける光学密度変化量を測定し、光学密度変化量から被検体中のCM化ヘモグロビン濃度を求めた。以上の操作には、自動分析装置TBA-30R形(東芝メディカル)を用いた。

##### 【0025】(6) 甲剤(CM化ヘモグロビン)の保存安定性の評価

試薬を静置し、転倒混和せずに37℃、5日間保存後の感度(30秒後から200秒までの波長804 nmにおける光学密度変化量)を測定した。その結果を表1に示した。

##### 【0026】

##### 【表1】

	抗体の種類	塩化コリン濃度(%)	試薬調製直後の感度(ΔOD)			37℃、5日後の感度(ΔOD)		
			全血	赤血球	血漿	全血	赤血球	血漿
実施例1	CM化ヘモグロビン抗体	8.0	213	214	2	213	212	1
実施例2	CM化ヘモグロビン抗体	6.0	225	222	3	220	219	3
実施例3	CM化ヘモグロビン抗体	4.0	261	256	8	241	236	4
実施例4	CM化ヘモグロビン抗体	2.0	290	278	27	253	239	4
実施例5	CM化ヘモグロビン抗体	1.0	332	301	41	277	258	18
実施例6	AGE化ヘモグロビン抗体	8.0	532	527	11	519	520	9
比較例1	CM化ヘモグロビン抗体	0	521	457	156	284	263	57
比較例2	CM化ヘモグロビン抗体	0.01	454	383	112	277	259	50

#### 【0027】実施例6

CM化ヘモグロビン抗体の代わりにAGE化ヘモグロビン抗体を用いたこと以外は実施例1と同様の操作で行った。結果を表1に示した。尚、AGE化ヘモグロビン抗体は、以下のように作製した。

##### 【0028】(1) AGE化ヘモグロビンの作製

0.15 Mの塩化ナトリウムを含む0.5 Mリン酸緩衝液1 mlに、ヒトヘモグロビン(SIGMA、フラクションV)を6 mg/ml、グルコースを0.17 Mとなるように溶解した。この溶解液を0.22 μmのフィルター

で濾過した後、37℃で2ヶ月間静置した。次いで、20 mMリン酸緩衝液(pH7.4)で4℃にて2日間透析され、未反応のグルコースを除去した後、AGE化ヘモグロビン抗体作製のための免疫原として供された。

【0029】(2) AGE化ヘモグロビン抗体の作製  
体重が2 kg以上のウサギに、上記作製したAGE化ヘモグロビンを抗原として、以下の要領で免疫した。2 mg/mlになるように調製した該抗原溶液0.5 mlに、フロイントの完全アジュバント0.5 mlを加えた

ものをウサギの耳静脈に注射した。その後、2週間おき

に2mg/mlの該抗原溶液0.25mlにフロイントの不完全アジュバント0.25mlを加えたものを追加免疫した。この間、AGE化ヘモグロビン抗体が産生されたか否かを確認するために、2週間に1回ウサギの外縁耳静脈から部分採血した。6週間後、AGE化ヘモグロビン抗体が産生されたことを酵素免疫測定(ELISA)法で確認し、全採血した。

【0030】(3)アフィニティ精製カラムの作製  
25mlのアフィゲル15(BIO-RAD)を75mlの10mM酢酸緩衝液(pH4.5)で洗浄した後、10mg/mlのヒトヘモグロビン溶液を62.5ml加え、室温で緩やかに攪拌した。次いで、未反応のヒトヘモグロビンを濾過にて除去し、1Mのエタノールアミンを30ml加え、室温で緩やかに攪拌し、未反応のN-ヒドロキシサクシイミドエステルをブロッキングした。該ヒトヘモグロビンを固定化した支持体をカラムに詰め、280nmの吸光度が0になるまでイオン交換水で洗浄した。更に、0.15Mの塩化ナトリウムを含む20mMのリン酸緩衝液(pH7.4)でカラムを平衡化した。

【0031】(4)AGE化ヘモグロビン抗体のアフィニティ精製  
作製したAGE化ヘモグロビン抗体を1mg/mlにな

るように0.15Mの塩化ナトリウムを含む20mMのリン酸緩衝液(pH7.4)で希釈したものを、100mg程度になるように該アフィニティ精製カラムにアブライした。次いで、280nmの吸光度が0になるまで前記リン酸緩衝液を流速0.5ml/minで流した。カラムに結合しなかった抗体をAGE化ヘモグロビン抗体として回収した。280nmの吸光度が0になったところで、リン酸緩衝液から0.1Mのグリシン緩衝液(pH3.0)に換え、カラムに結合している抗体を溶離させ、0.15Mの塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)でカラムを平衡化し、回収した抗体を再度カラムにアブライし、カラムに結合しなかった抗体を回収した。次いで、50mMのグリシン緩衝液(pH8.2)で透析し、ラテックス凝集法の抗体として供された。

【0032】比較例1

塩化コリンを用いない以外は実施例1と同様の操作で行った。結果を表1に示した。

【0033】比較例2

20 8%塩化コリンの代わりに、0.01%塩化コリンを用いたこと以外は実施例1と同様の操作で行った。結果を表1に示した。